

J. Clin. Chem. Clin. Biochem.

Vol. 26, 1988, pp. 549—558

© 1988 Walter de Gruyter & Co.
Berlin · New York

Untersuchungen zur Reaktion von Weizenkeimlektin mit Glykoproteinen des Serums

Lektine als Reagentien, III. Mitteilung

Von K. Lorentz und R. Zierke¹⁾

Institut für Klinische Chemie der Medizinischen Universität zu Lübeck

(Eingegangen am 24. August 1987//15. Januar/15. Juli 1988)

Zusammenfassung: Lösungen von Weizenkeimlektin reagieren selektiv, aber unvollständig mit Glykoproteinen des Serums, die N-Acetylneuraminsäure enthalten, nämlich (mit abnehmender Intensität) mit α_2 -Makroglobulin, Haptoglobin, Hämopectin, Immunglobulin A, α_1 -saurem Glykoprotein, Immunglobulin M und anderen. Die Fällung verläuft nicht stöchiometrisch und hängt von folgenden Variablen ab: Lektin- und Polyethylenglykolkonzentration, Temperatur, pH-Wert, Ionenstärke und Einflüssen der Matrix. Wahrscheinlich wird die Reaktion durch spezifische und elektrostatische Kontakte des Lektins mit Sialylresten des Glykoproteins eingeleitet, denen die Bindung an N-Acetylglucosamin-Gruppen folgt. Eine minimale Wechselwirkung von Albumin beruht auf Komplexbildung mit reaktiven Proteinen über die Ausbildung von Disulfidbrücken.

Obwohl die Fällung mit Weizenkeimlektin Sialoproteine des Serums empfindlich nachweist, entsprechen ihre Ergebnisse nicht dem N-Acetylneuraminsäuregehalt von Glykoproteinen im Serum. Dies stellt die analytische Eignung des Lektins zur quantitativen Messung von Sialokonjugaten in Frage.

Studies on the reaction of wheat germ agglutinin with serum glycoproteins — Lectins as reagents, III.

Summary: Solutions of wheat germ agglutinin exclusively but incompletely react with serum glycoproteins containing N-acetylneuraminic acid, viz. α_2 -macroglobulin, haptoglobin, haemopexin, immunoglobulin A, α_1 -acid glycoprotein, ceruloplasmin, immunoglobulin M (in decreasing order) and others. The precipitation does not proceed stoichiometrically and depends on lectin and polyethyleneglycol concentration, temperature, pH-value, ionic strength, and matrix effects. Presumably, the reaction is initiated by specific and electrostatic interactions of wheat germ agglutinin with sialic acid residues of the glycoprotein and followed by binding of N-acetylglucosamine residues. A minimal precipitation of albumin is due to its complex formation with glycoproteins via disulphide bonds.

Although wheat germ lectin precipitation sensitively detects serum sialoproteins, its intensity does not reflect the amount of N-acetylneuraminic acid in serum glycoproteins, thus calling in question the analytical use of this lectin for the measurement of sialoglycoconjugates.

Einführung

In früheren Untersuchungen ließ sich die Mikroheterogenität mikrosomaler Enzyme durch Fällung mit

Lektinlösungen nachweisen (1, 2). Die Abspaltung von N-Acetylneuraminsäure veränderte dabei nie die Bindung dieser Glykoproteine an Concanavalin A, doch wurde ihre Reaktion mit Weizenkeimlektin in Seren stark vermindert (1) und in Leberextrakten sogar aufgehoben (2). Da N-Acetylglucosamin die

¹⁾ Die Arbeit enthält wesentliche Teile der Inauguraldissertation von R. Zierke

Wechselwirkung von Glykoproteinen mit Weizenkeimlektin etwa fünfmal stärker hemmt als N-Acetylneuraminsäure (3, 4), wurden — abgesehen von einer Mitteilung über die Bindung von α_2 -Makroglobulin (5) — vor allem N-Acetylglucosamin-Sequenzen als entscheidende Komponenten bei der Interaktion von Lektin aus *Triticum vulgare* mit Glykoproteinen des Serums angesehen (6).

Wir prüften daher die Bedeutung von N-Acetylneuraminsäure für die Präzipitation von Glykoproteinen durch gelöstes Weizenkeimlektin und beurteilten sie nach folgenden Kriterien:

- Fällungscharakteristik verschiedener Glykoproteine,
- Verteilung der sialinsäurehaltigen Proteine in Überständen und Präzipitaten und
- Veränderung der Ergebnisse durch Vorbehandlung der Proben mit Neuraminidase und Exoglucosidasen oder durch einen Wechsel der Reaktionsbedingungen.

Material und Methoden

Geräte, Material und Reagenzien

Mikroliter-System und Photometer 1101 M (mit Kompensationsschreiber 4412) waren von Eppendorf Gerätebau (Hamburg), die Geräte zur Disk-Elektrophorese von Biomol (Ilvesheim) und die Kapillardosierer SMI-micropettor® von Scientific Manufacturing Industries (Richmond, CA 94710). Zur Chromatographie benutzten wir 1-ml-Insulinspritzen von Braun (Melsungen) als Mikrosäulen.

Wir untersuchten kommerzielle Proteinstandards und 10 Seren: 5 zeigten einen Proteingehalt von 65–72 g/l mit unauffälliger Verteilung in der Elektrophorese auf Celluloseacetat (I), und 5 Dysproteinämien mit erhöhter α_2 -Globulinkonzentration von 8–10 g/l (II). Für orientierende Vorversuche benutzten wir jeweils ein Poolserum aus diesen beiden Gruppen I und II.

Wir verwendeten folgende Lektine (Herkunft, relative Molmasse): Weizenkeimlektin (*Triticum vulgare*, $M_r = 36\,000$) von Boehringer (Mannheim), Concanavalin A (*Canavalia ensiformis*, $M_r = 51\,000$) und Weizenkeimlektin-Sepharose von Pharmacia (Freiburg), succinyliertes Weizenkeimlektin und Schneckenlektin (*Limax flavus*, $M_r = 44\,000$) von medac (Hamburg). Methyl- α -D-mannosid, N-Acetylglucosamin und N-Acetylneuraminsäure stammten von Serva (Heidelberg), die Enzymsubstrate (außer 4-Nitrophenylphosphat und Butylrylthiocholinjodid), Glucosidasen und Neuraminidase (EC 3.2.1.18) aus *Cl. perfringens* (1 mg = 0,6 U) von Boehringer (Mannheim), während Humanserumalbumin, Proteinstandards, Antiseren und Partigen®-Immundiffusionsplatten von den Behringwerken geliefert wurden. Die anderen Reagenzien bezogen wir in bestmöglicher Qualität von E. Merck (Darmstadt). Alle Lösungen wurden mit bidestilliertem Wasser angesetzt. Die katalytische Konzentration von α -Glucosidase bestimmten wir mit Maltose, die der anderen Exoglucosidasen mit den entsprechenden 4-Nitrophenylglucosiden und die Aktivität des Schneckenlektins durch Hämagglutination.

Vorgehen

Tabelle 1 bezeichnet die Reihenfolge der Untersuchungen. Um die Spezifität der Bindung zu prüfen, wurden Proben vor der

Fällung mit Exoglucosidasen in den Puffern A und B inkubiert oder — in Gegenwart verschiedener Zusätze — mit Lektin in Puffer C versetzt:

Puffer A (Acetat-Triethanolamin 250 mmol/l, Calciumchlorid 20 mmol/l, Magnesiumchlorid 4 mmol/l, pH 5,0) wurde zur Vorinkubation der Proben mit Neuraminidase 300 U/l und/oder Glucosidasen mit Wirkungsoptimum im sauren Bereich (α -Mannosidase 1 kU/l, α -Galaktosidase 1 kU/l, β -Glucosidase 2 kU/l, β -N-Acetyl-D-Glucosaminidase 400 U/l) benutzt oder ohne Zusatz dieser Enzyme als Kontrolle.

Mit Puffer B (Triethanolamin-Acetat 1 mol/l, Calciumchlorid 2 mmol/l, Magnesiumchlorid 2 mmol/l, Mangan-II-chlorid 20 μ mol/l, pH 7,7) brachten wir die Ansätze nach der Inkubation mit Puffer A auf pH 7,2 und behandelten mit weiteren Enzymen (α -Glucosidase 5 kU/l, β -Galaktosidase 7,5 kU/l).

Puffer C (Acetat-Tris 100 mmol/l, Calciumchlorid 500 μ mol/l, Magnesiumchlorid 500 μ mol/l, Mangan-II-chlorid 10 μ mol/l, pH 7,2) enthielt die Lektine zur Fällung, in Parallelansätzen auch Thiole oder bindungsspezifische Zucker oder — zur Prüfung auf hydrophobe Wechselwirkungen — Natriumchlorid oder Ethylenglykol. Er diente ohne Lektine als Kontrolle und mit Zusatz bindungsspezifischer Zucker zum Auflösen der Niederschläge. Sein pH-Wert wurde zur Ermittlung des Fällungsoptimums durch Veränderung der Tris-Konzentration eingestellt. Die gelösten Lektine zentrifugierten wir vor Gebrauch bei 25 °C 5 min mit 9000 g. Die durch Vorbehandlung (Tab. 1: Verfahren 1–3) auftretenden Verluste an katalytischer und immunologischer Aktivität ermittelten wir durch Vergleich mit dem Standardsatz ohne Vorinkubation (Tab. 1, oben).

Fällung

Wir mischten 1 Tl. Probe (z. B. 50 μ l Serum) im Reaktionsgefäß 3810 mit 3 Tln. Lektin (z. B. 150 μ l) in Puffer C, rüttelten den Ansatz 3 \times 30 s (Rotationsmischer 3300) und inkubierten ihn anschließend 60 min bei 25 °C (Thermostat 3401). Längere Reaktionszeiten lieferten identische Ergebnisse. Dieselbe Präzision erreicht man mit Mikroverfahren (20 μ l Probe und 60 μ l Lektinlösung im Zentrifugengefäß 0,4 ml). Da Weizenkeimlektin bei pH 7,0 und 5 °C in Konzentrationen über 60 μ mol/l ausfällt, wurden die Ansätze bei Arbeitsunterbrechungen nicht abgekühlt, sondern bis zu 36 h bei 25 °C verschlossen gehalten. Nach 5 min Zentrifugation mit 9900 g (Zentrifuge 5412 oder 5413) mit vollständiger Abtrennung des Überstandes wurde der Niederschlag mit zweimal 200 μ l Puffer C oder Natriumchlorid 154 mmol/l gewaschen.

Die vereinigten Wascheluate enthielten in keinem Fall mehr als 2–4% der folgenden Kenngrößen und wurden daher nur zur Ermittlung der Wiederfindung bei der Fällung untersucht: Sie betrug bei Enzymen $97 \pm 3,2\%$, bei N-Acetylneuraminsäure $98 \pm 2,6\%$, bei Gesamteiweiß $99 \pm 3,1\%$ und bei immunologisch bestimmten Proteinen $96 \pm 3,1\%$ ($n = 15$).

Anschließend lösten wir die Niederschläge entweder direkt in Biuret-Reagenz (zur Proteinbestimmung) oder Schwefelsäure (N-Acetylneuraminsäure-Bestimmung) oder durch Anreiben mit Puffer C, der Methyl- α -D-mannosid 1 mol/l, N-Acetylglucosamin 0,6 mol/l oder N-Acetylneuraminsäure 0,25 mol/l enthielt, auf das ursprüngliche Ansatzvolumen von 200 oder 80 μ l (für die Elektrophorese, immunologische und Enzymbestimmungen). Durch Vorbehandlung stark gepufferte Überstände und Überstände für die Bestimmung von N-Acetylneuraminsäure wurden dialysiert (s. u.).

Bestimmungen

Kriterium der Reaktion mit Lektinen war die Verteilung von definierten Glykoproteinen, Gesamteiweiß und N-Acetylneuraminsäure zwischen Überstand und Niederschlag. Wir ermittelten die Variationskoeffizienten für die Impräzision des ge-

Wilhelm Friedrich Vitamins

1988. 17 cm x 24 cm. XII, 1062 pages. Hardcover. DM 380,-; approx. US \$225.00 ISBN 3 11 010144 7

A comprehensive, authoritative Handbook and reference source of all aspects of vitamins.

The book at a glance

- Complete and systematic overview of all water- and fat-soluble vitamins
- Introductory chapter presenting basic general information on the vitamins
- Numerous illustrations, formulas, tables, etc.
- Comprehensive and up-to-date bibliographic references at the end of each chapter
- Supplementary bibliography of publications that appeared subsequent to completion of the editorial work on the book

From the Contents

Introduction · Vitamin A and its Provitamins · Vitamin D · Vitamin E · Vitamin K · Thiamin (Vitamin B₁, Aneurin) · Vitamin B₂: Riboflavin and its Bioactive Variants · Niacin: Nicotinic Acid, Nicotinamide, NAD (P) · Vitamin B₆ · Folic Acid and Unconjugated Pteridines · Biotin · Pantothenic Acid · Vitamin B₁₂ · Vitamin C · Literature Supplement · Subject Index



de Gruyter · Berlin · New York

Verlag Walter de Gruyter & Co., Genthiner Str. 13, D-1000 Berlin 30, Tel.: (0 30) 2 60 05-0, Telex 1 84 027
Walter de Gruyter, Inc., 200 Saw Mill River Road, Hawthorne, N. Y. 10532, Tel. (914) 747-0110, Telex 64 66 77

MAC '88

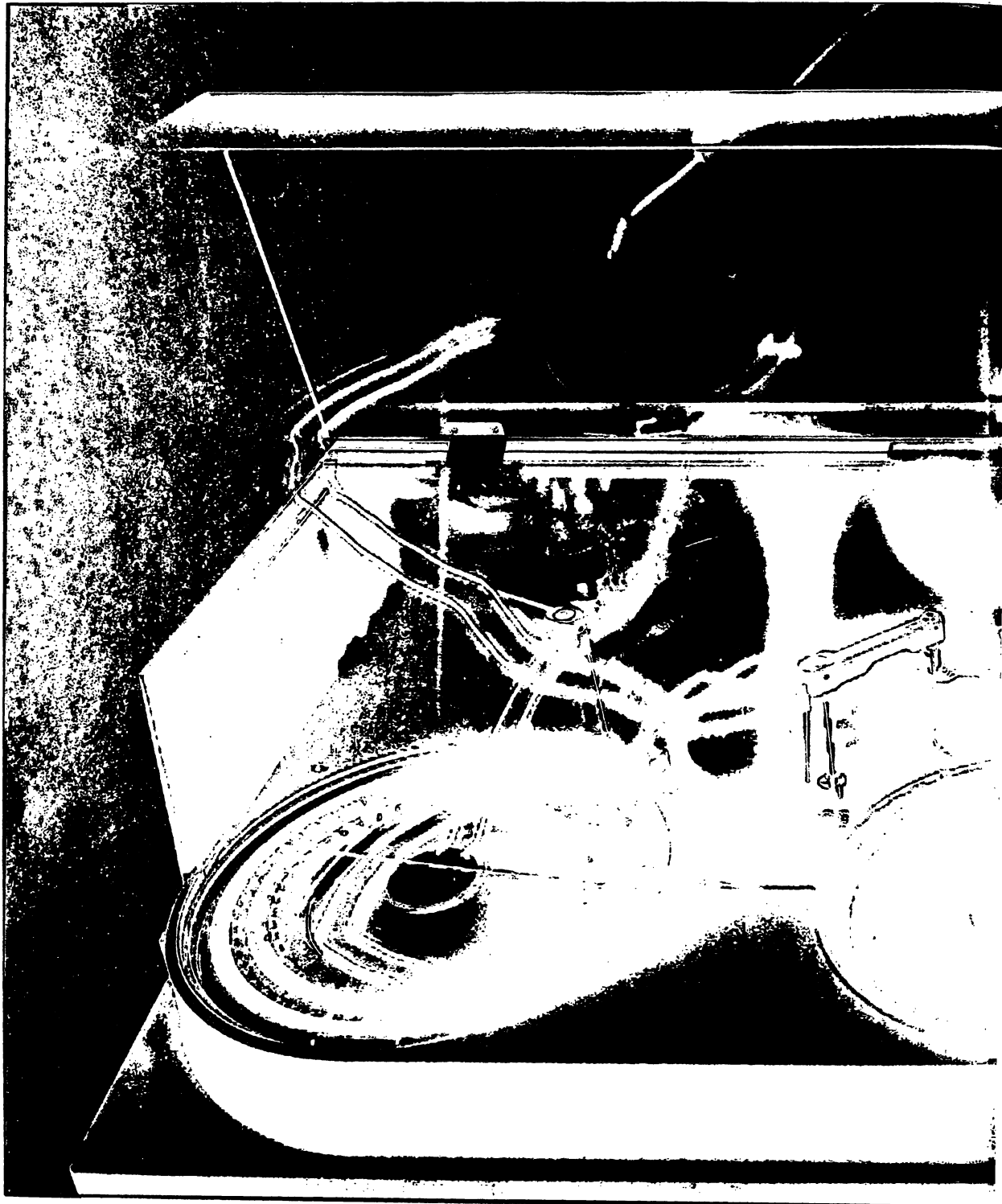
28th INTERNATIONAL
EXHIBITION OF CHEMISTRY,
ANALYSIS, RESEARCH,
TEST EQUIPMENT
AND BIOTECHNOLOGIES
22-26 NOVEMBER 1988
Milan Fair - Pavilions 2-3-7-33-35
Entrance: Porta VI Febbraio

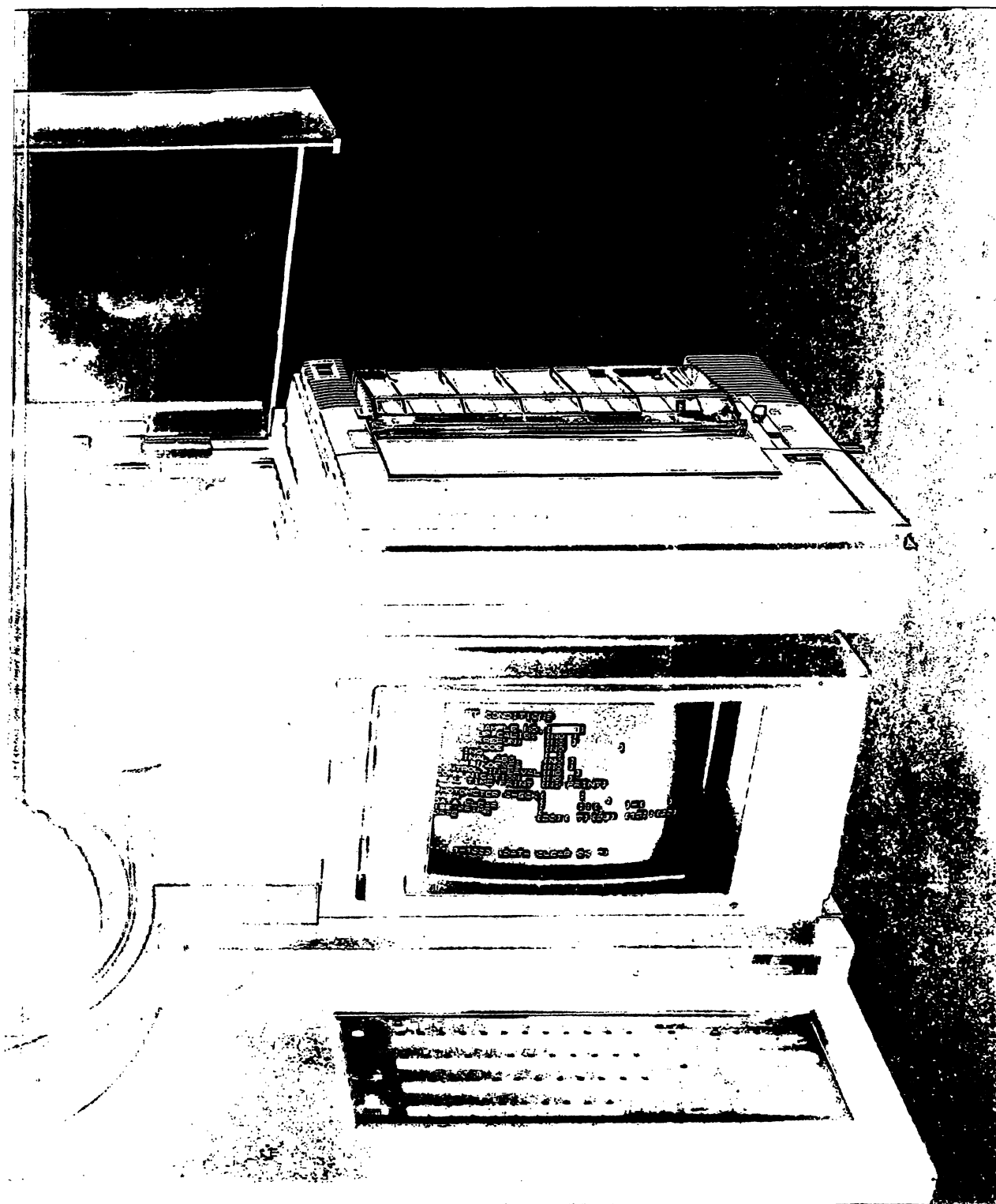
CONVENTIONS
24-26 November 1988
ATB '88 - "Advanced Technology for the
Clinical Laboratory and Biotechnologies"
4th European Edition of the Oak Ridge Conference.
In co-operation with S.I. Bio.C. and A.A.C.C.

22-23 November 1988
"FOOD SAFETY: NEW METHODS FOR RESEARCH AND CONTROL"
In co-operation with Tecnoalimenti SpA and the Institute of pharmacological Sciences, Milan.

General Secretariat MAC:
20149 MILANO - VIA DOMENICHINO, 11
C.P. 15117 - 20150 MILAN, ITALY
TEL 02/4815541 - TELEX 313627

***Bereits 150 Laboratorien in Deutschland
arbeiten mit BM/Hitachi 717 Systemen.
Dieser Erfolg ist unsere beste Empfehlung.***





***BM/Hitachi 717.
Denn Sie haben Anspruch auf 1. Wahl.***



Boehringer Mannheim GmbH
6800 Mannheim 31

The Roots of Modern Biochemistry

Fritz Lipmann's Squiggle and its Consequences

Editors *Horst Kleinkauf, Hans von Döhren, Lothar Jaenicke*

1988. 17 cm x 24 cm. XII, 988 pages. Numerous illustrations.
Hardcover. DM 448,-; approx. US \$263.00 ISBN 3 11 011585 9

A Fritz Lipmann dedicatory volume, originating from the Memorial Meeting held in Berlin-Dahlem in 1987, presenting the major aspects of modern biochemistry and their development in 90 essays. The Warburg/Meyerhof era, the time of emigration and postwar science are revived. Contemporaries and coworkers together with other outstanding scientists describe the state of biochemistry in major fields: as it was, as it is now, and where it will be going. At the same time this volume is a reference book on Fritz Lipmann, the outstanding biochemist, and life scientist, who considered his concept of the energy-rich bond, symbolized by the squiggle, as his major achievement.

From the Contents

Fritz Lipmann 1899–1986 · Biochemistry Comes of Age ·
Molecular Biology Sharpens its Tools · Functional Dynamics:
The Squiggle-Symbol of Bioenergetics; Molecular Recognition and
Communication · Evolution · List of Contributors · Lipmann's
Coworkers at Massachusetts General Hospital, Boston, and the
Rockefeller University, New York · Fritz Lipmann: Bibliography
1924–1985 · Author Index · Subject Index

Price is subject to change without notice



de Gruyter · Berlin · New York

Verlag Walter de Gruyter & Co., Genthiner Str. 13, D-1000 Berlin 30, Tel.: (030) 2 60 05-0, Telex 184 027
Walter de Gruyter, Inc., 200 Saw Mill River Road, Hawthorne, N. Y. 10532, Tel. (914) 747-0110, Telex 64 66 77

Tab. 1. Schema zur Reaktion von Glykoproteinen mit Weizenkeimlektin. Angabe der Volumina in μl bei Reaktionsgefäßen 3810 oder 3812, in Klammern Mikroansätze in Zentrifugegefäßen 0,4 ml Eppendorf.

Reaktion ohne Vorbehandlung	Kontrollansatz (ohne Lektin)	Reaktion in Gegenwart von Natriumchlorid, Ethylenglykol, Triton X-100, 2-Mercapto- ethanol und bindungsspezifischen Zuckern	
Serum oder Proteinlösung	50 (20)	50 (20)	
Puffer C	160 (60)		
Puffer C mit Lektin \pm Zusatz		150 (60)	
60 min Reaktion bei 25 °C, 5 min Zentrifugation 9900 g, Dialyse des Überstands bei bindungsspezifischen Zuckern und Ethylenglykol, Un- tersuchung von Überstand und Niederschlag.			
Reaktion nach Vorbehandlung	(1) Kontrolle	(2) Abbau mit Neuraminidase	(3) Abbau mit Neuraminidase und Glucosidasen
Serum (Proteinlösung)	500	500	500
Puffer A	800	800	800
Neuraminidase		200	200
α -Mannosidase			50
α -Galaktosidase			50
β -Glucosidase			50
β -N-Acetyl- <i>D</i> -glucosaminidase			50
Inkubation 36 h bei 25 °C und pH 5,38—5,47			
Puffer B	800	800	700
β -Galaktosidase			50
α -Glucosidase			50
Bidest. Wasser	200		
Inkubation 36 h bei 25 °C und pH 7,15—7,22 in Dialyse und Entnahme zur Reaktion mit 3 Tln. Lektin (s. o.)			

samten Verfahrens durch Untersuchung von jeweils 13 Niederschlägen in Serie. Die entsprechenden Werte sind nachfolgend jeder Bestimmung in Klammern beigelegt. Überstände und unbehandelte Seren wiesen – wegen der entbehrlichen Auflösung durch Anreiben – ungefähr halb so große, Waschfraktionen zehnfach höhere Variationskoeffizienten (VK) bei folgenden Methoden auf:

- Kontinuierliche Bestimmung (VK 3,7–5,1%) der katalytischen Konzentrationen von Cholinesterase (EC 3.1.1.8), alkalischer Phosphatase (EC 3.1.3.1), γ -Glutamyltransferase (EC 2.3.2.2) und mikrosomaler Arylamidase (EC 3.4.11.2) bei 25 °C mit 2–50 μl Probevolumen entsprechend der I. Mitteilung (1).
- Messung des Proteingehalts (VK 2,6–3,2%) in 20 μl Serum, 50 μl Überstand oder im gesamten Präzipitat nach 30 min Reaktion mit 1,0 ml Biuret-Reagenz (7) oder mit 400 μl bei Mikroansätzen.
- Chemische Bestimmung der Konzentration von N-Acetylneuraminsäure in 5 μl Serum (VK 3,3–3,8%), 20–50 μl Überstand oder im gesamten Niederschlag (VK 8,9%) mit einer Modifikation (8) der Thiobarbitursäure-Methode von Warren (9). Wegen der Störung durch Kohlenhydrate und Ethylenglykol (8) dialysierten wir diese Ansätze und stark gepufferte Überstände mit einer Mikromethode (10) gegen viermal 50 Tle. Natriumchlorid 15 mmol/l. Niederschläge wurden direkt in 150 μl Schwefelsäure 67 mmol/l aufgenommen. In allen Fällen berücksichtigten wir den dabei eintretenden Verlust von 11,5% (8). Nach dieser Korrektur betrugen die so bestimmten Werte $105 \pm 7\%$ ($n = 10$) der nach enzymatischer Hydrolyse (mit Neuraminidase 300 U/l für 16 h bei 25 °C und pH 5,5).

- Quantifizierung einzelner Proteine durch radiale Immundiffusion mit Volumina von 5–20 μl (VK 2,0% bei 1,8 g/l bzw. 5,2% bei 0,6 g/l für saures α_1 -Glykoprotein im Serum; VK 9,9% für Immunglobulin A 0,7 g/l und für Haptoglobin 0,5 g/l im Niederschlag). Probenverdünnung und -volumen sowie die Nachweisempfindlichkeit der M- oder LC-Partigen®-Platten paßten wir der Konzentration des Analyten an.

Chromatographie, Elektrophorese und Neoglykoproteinsynthese

Zum Vergleich der beschriebenen Fällung von Serum und Proteinstandards mit der Adsorption durch immobilisiertes Weizenkeimlektin wurden 100 μl Probe auf 780 μl Gel (Höhe 40 mm, Durchmesser 5 mm) mit Puffer C in einer Mikrosäule chromatographiert und mit einem Zusatz von N-Acetylneuraminsäure bzw. N-Acetylglucosamin 500 mmol/l eluiert.

Die Elektrophorese in Polyacrylamidgel entsprach der bisherigen Technik (1, 2, 11): Trennung von 2–10 μl Probe über 18 h mit 40 V in linearen Gradienten (Polyacrylamid 36–216 g/l, Länge 75 mm, Durchmesser 4,8 mm, Rotationswinkel 5°, Gelpuffer pH 8,5: Tris 1,5 mol/l, Schwefelsäure 100 mmol/l, Elektrodenspuffer pH 8,6: Tris 45,5 mmol/l, Glycin 192 mmol/l). Darstellung der Proteine mit Amidoschwarz, immunologische Identifizierung aus 1 mm dicken Segmenten. Das Gel läßt Teilchen mit einem isoelektrischen Punkt über 8,6 und einer relativen Molmasse (M_r) über $2,5 \times 10^6$ nicht eintreten.

Schließlich untersuchten wir den Einfluß einer Neoglykoproteinsynthese auf das Bindungsverhalten von Albumin wie folgt: Inkubation von Humanalbumin 40 g/l mit D-Mannose, N-Acetylneuraminsäure oder N-Acetylglucosamin jeweils 5 und

100 mmol/l gelöst in Natriumchlorid 50 mmol/l, Natriumazid 0,3 mmol/l und Phosphat 50 mmol/l pH 7,0 für 6 d in Reaktionsgefäßen 3812 bei 30 °C nach Sterilfiltration mit Millex-GS® (Millipore S. A., Molsheim, Frankreich). Anschließend wurde 4 × 8 h gegen 1000 Tle. Phosphat 50 mmol/l pH 7,0 dialysiert (10) und zuletzt mit Lektinen gefällt.

Alle genannten Konzentrationen bezeichnen die Verhältnisse im jeweiligen Ansatz. Wegen der unterschiedlichen Volumina rechneten wir die Konzentrationen zur Bilanzierung in Massen (μg bei Proteinen) oder katalytische Mengen (mU bei Enzymen) um und gaben sie einheitlich als numerische Fraktion (mit Mittelwert und Standardabweichung) der Meßgröße im Kontrollansatz (= 1,0) an. Die Ergebnisse wurden bei Gauss-Verteilung mit den üblichen statistischen Verfahren und bei abweichenden Verteilungen mit parameterfreien Tests geprüft.

Ergebnisse

Verhalten von Serumproteinen

Der Protein- und Sialinsäuregehalt des Niederschlags nahm bei der Fällung durch steigende Konzentrationen von Weizenkeimlektin unterschiedlich zu. Während die Biuret-Reaktion bis zu 240 $\mu\text{mol/l}$ annähernd linear anstieg, erhöhte sich der Sialinsäuregehalt nur in Form einer flachen Sättigungskurve, der die komplementäre Abnahme von N-Acetylneuraminsäure im Überstand entsprach. So blieben bei 25 °C und 120 $\mu\text{mol/l}$ noch 65% der eiweißgebundenen Sialinsäure im Überstand, bei 240 $\mu\text{mol/l}$ etwa 50% und bei 360 $\mu\text{mol/l}$ ungefähr 30% (Abb. 1). Damit nahm der Quotient N-Acetylneuraminsäure/Protein im Überstand mit steigender Lektinkonzentration zu. Auch bei sequentieller Technik, d. h. bei fraktionierter Zugabe von Lektin mit intermittierendem Zentrifugieren der Ansätze, erhielt man dieselbe Fällungskurve. Proteinstandards und Seren mit normalem (I) oder hohem (II) Glykoproteingehalt verhielten sich gleich.

Wegen der begrenzten Löslichkeit von Weizenkeimlektin mußte unter ständigem Rütteln bei 25 °C inkubiert werden. Kühlt man vor dem Zentrifugieren auf 5 °C ab, so fiel bereits bei 120 $\mu\text{mol/l}$ der lösliche Sialinsäureanteil von 60–70% auf 30–35% ab, d. h. ein Teil der Lektin-Glykoprotein-Komplexe blieb nur bei 25 °C in Lösung. Die Fällung wurde stets durch den Zusatz von N-Acetylneuraminsäure 0,25 mol/l oder N-Acetylglucosamin 0,6 mol/l vollständig unterdrückt. Dagegen wurden nach Vorbehandlung mit Neuraminidase durch Weizenkeimlektin 240 $\mu\text{mol/l}$ zwar nur $2 \pm 3\%$ der Sialoproteine gefällt aber etwa 10% des Gesamtproteins (Abb. 1). Dies deutete, ebenso wie die oben genannte Änderung des Sialinsäure-Protein-Quotienten, auf einen zunehmenden Einfluß von N-Acetylglucosamin bei höheren Lektinkonzentrationen.

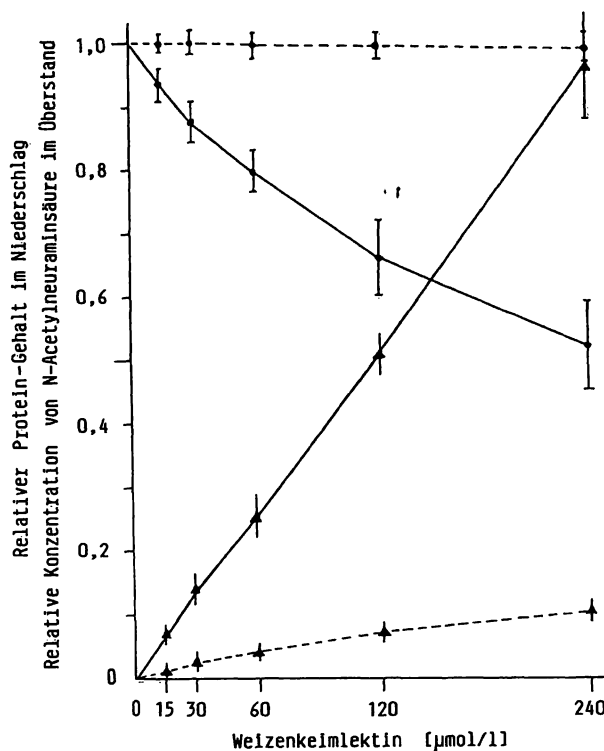


Abb. 1. Relative Konzentration (Ordinate) von N-Acetylneuraminsäure (●) im Überstand und Protein (Δ) im Niederschlag von 10 Seren (Mittelwert und Standardabweichung) nach Fällung mit Weizenkeimlektin 0–240 $\mu\text{mol/l}$ bei 25 °C (Abszisse). Ausgezogene Linien: Werte ohne Vorbehandlung, unterbrochene Linien: nach Inkubation mit Neuraminidase. Die Dezimalzahlen der Ordinate beziehen sich auf die Konzentration von N-Acetylneuraminsäure in der Kontrolle oder auf den mit Weizenkeimlektin 360 $\mu\text{mol/l}$ fällbaren Proteingehalt (jeweils 1,0). Vorgehen s. Methoden.

Die Fällung der Serumproteine entsprach im wesentlichen ihrer Adsorption durch immobilisiertes Weizenkeimlektin in Mikrosäulen und Angaben der Literatur (6, 12). Die Daten von Tabelle 2 zeigen dabei im einzelnen folgende Ergebnisse:

- Weizenkeimlektin fällte nur einige Glykoproteine und diese nicht vollständig. So reagierten α_2 -Makroglobulin und Haptoglobin zu mehr als 70%, Hämoexin und Immunglobulin A zu mehr als 25%, aber von saurem α_1 -Glykoprotein, Coeruloplasmin und Immunglobulin M fanden sich nur 10–20% im Niederschlag. Geringer, aber konstant wurden β_2 -Glykoprotein I, Antithrombin III, C1s-Inaktivator und C3c gefällt. Wegen der höheren Empfindlichkeit der Präzipitationstechnik gegenüber der Adsorption zeigte sie, allerdings nicht bei allen Seren, auch eine minimale Lektinreaktion von α_2 -HS-Glykoprotein, α_1 -Antitrypsin, C4 und Immunglobulin G an.
- Zwischen der mittleren Konzentration von N-Acetylglucosamin und N-Acetylneuraminsäure in den untersuchten Serumproteinen und ihrer Reaktivi-

Tab. 2. Fällung von Proteinen aus Seren und Standardlösungen mit Weizenkeimlektin 240 $\mu\text{mol/l}$: Darstellung durch Polyacrylamidgel-Elektrophorese, Identifizierung (aus Gelsegmenten) und Bestimmung (aus Niederschlägen) durch radiale Immundiffusion.

Vergleich der Fällung durch gelöstes und der Bindung durch immobilisiertes Weizenkeim-Lektin (6, 12) mit dem Gehalt einzelner Proteine an N-Acetylglucosamin (GlcNAc) und N-Acetylneuraminsäure (NeuNAc) sowie der mittleren Konzentration beider Zucker als Produkt aus der Konzentration (13) des Proteins im Serum und seinem Glykananteil (nach l. c. (14, 15)).

Elektrophorese-Fraktion im Präzipitat: — negativ, (+) schwach, + stark. Prozentuale Angabe des gefällten oder gebundenen Anteils bei der Immundiffusion aus der Untersuchung von 5 unauffälligen (I) und 5 dysproteinämischen (II) Seren bzw. Plasmen (für Antithrombin III) sowie 5 Proteinstandards (s. Material und Methoden).

Protein	Reaktion mit Weizenkeimlektin				Gehalt (mol/mol)		Konzentration im Serum ($\mu\text{mol/l}$)	
	240 $\mu\text{mol/l}$		immobilisiert		GlcNAc	NeuNAc	GlcNAc	NeuNAc
	Eigene Ergebnisse Seren Standards Gel Immundiffusion		Vretblad & Hjorth (6)	Nilsson & Bog-Hansen (12)				
Thyroxinbindendes Globulin	—	0%			11	4	4,6	0,16
β_2 -Glykoprotein I	(+)	5–10% 35%			16	6,5	80	32,5
Saures α_1 -Glykoprotein	+	12–20% 80%	stark	50%	31	15	620	300
α_2 -HS-Glykoprotein	—	0– 5% 40%	stark		6,5	8	80	98
Präalbumin	—	0%		0%	—	—	—	—
Gc-Globulin	—	0%		0%	3,3	—	28	—
α_1 -Antitrypsin	—	0– 5%	schwach	0%	13	7	625	335
Hämopexin	+	30–50% 90%	sehr stark	50%	12	13	165	170
Antithrombin III	?	5–10%	stark	0%	17	6,5	60	25
Albumin	+	2– 5% —	minimal	0%	—	—	—	—
α_1 -Antichymotrypsin	(+)	nicht bestimmt	stark	50%	21	16	135	100
Transferrin	+	0%		0%	6,7	3,5	250	130
C3-Aktivator	—	0%			23	5	52	12
Haptoglobin	+	70–85% 95%	stark	50%	39	17	1950	850
C1s-Inaktivator	?	5–10%			49,5	45	115	105
Coeruloplasmin	+	10–15%	sehr stark	30%	33	9	90	25
Immunglobulin G	(+)	0– 5%	schwach	0%	11,8	1	985	85
Immunglobulin A	+	25–30%	schwach	0%	15,7	9,5	205	125
C3c (β_1 A/ β_1 C-Globulin)	+	5–10% 20%						
C4 (β_1 -E-Globulin)	—	0– 5% 10%		0%				
α_2 -Makroglobulin	+	80–95% 95%	stark	30%	100	44	320	140
Immunglobulin M	(+)	10–15%	schwach	0%	140	38	240	65

? Die Position der Bande ist unsicher Leere Felder: keine Daten verfügbar

tät mit Weizenkeimlektin bestand offenbar keine Beziehung. So verblieben α_1 -Antitrypsin, Immunglobulin G und Transferrin trotz ihres hohen Anteils an der gesamten Serum-Konzentration von N-Acetylglucosamin und N-Acetylneuraminsäure beinahe vollständig in Lösung, während stets ein geringer Anteil des kohlenhydratfreien Albumins ausfiel.

Nach Vorbehandlung mit Neuraminidase erschienen alle Glykoproteine, die sonst partiell durch Weizenkeimlektin 120 $\mu\text{mol/l}$ gefällt wurden, zu über 95% im Überstand, während minimale Albuminanteile weiterhin präzipitierten. Dies beobachtete man auch in Gegenwart von N-Acetylglucosamin 0,6 mol/l oder N-Acetylneuraminsäure 0,25 mol/l. Pherogramme der Überstände und Niederschläge zeigten diese Ergebnisse nur qualitativ. Sie ergaben komplementäre Fraktionen, deren Addition das Muster der Kontrolle lieferte (Abb. 2).

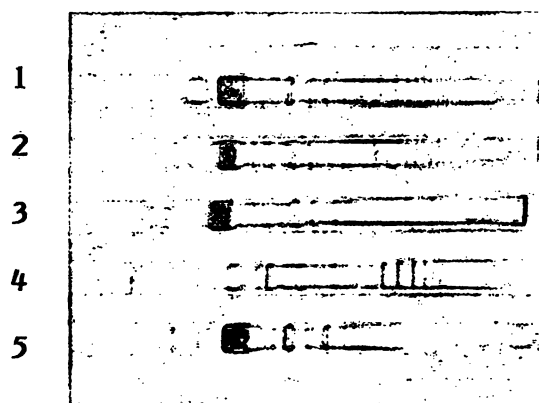


Abb. 2. Pherogramme von Serum nach verschiedener Vorbehandlung. Von oben nach unten:

- (1) nativ
- (2) nach Inkubation mit Neuraminidase,
- (3) Überstand nach Fällung mit Concanavalin A 120 $\mu\text{mol/l}$,
- (4) Niederschlag und
- (5) Überstand nach Fällung mit Weizenkeimlektin, Anode links. Vorgehen s. Methoden.

Reaktionsbedingungen und Spezifität

Die stark voneinander abweichenden isoelektrischen Punkte (IP) des Weizenkeimlektins (IP 8,5) und der meisten Proteine (IP 5,2–6,5) des Serums setzten einer Veränderung des Reaktionsmilieus aus Gründen der Löslichkeit Grenzen. So stieg der gefällte Anteil von Cholinesterase und alkalischer Phosphatase von pH 4,0 bis 7,0 an, während er bei Arylamidase und γ -Glutamyltransferase um 30% abnahm (Tab. 3). Wegen der mangelnden Stabilität im sauren Bereich, vor allem von Arylamidase und alkalischer Phosphatase, wurde daher bei pH 7,0 gearbeitet.

Die Abnahme des löslichen Enzymanteils (E) mit steigender Lektinkonzentration (L) entsprach dem in Abbildung 1 gezeigten Verhalten von N-Acetylneuraminsäure. Sie war durch die Funktionen E, $\log E$ bzw. $1/E$ gegen $1/L$, $1/L^2$, $1/L^4$, $\log L$ und $\ln L$ nicht als Gerade darzustellen. Mit der Abnahme von Sialoproteinen im Überstand bestand, vor allem bei Cholinesterase und alkalischer Phosphatase, eine enge Korrelation (Abb. 3). Beide Enzyme wurden relativ stärker als die proteingebundene Sialinsäure, aber nicht vollständig präzipitiert. In allen Ansätzen verminderte Neuraminidase die Fällung entscheidend. Die nach ihrer Einwirkung nur noch minimale Reaktion entsprach exakt der von succinyliertem Weizenkeimlektin, das ausschließlich mit N-Acetylglucosaminresten reagiert (4).

Im übrigen führte die ausschließliche Behandlung mit Glucosidasen nicht zu Veränderungen gegenüber den Kontrollen (Ansatz 1), auch hatte ihr Zusatz keinen Einfluß auf die Hydrolyse mit Neuraminidase, d. h. zwischen den Ergebnissen der Ansätze 2 und 3 bestand kein Unterschied. Diese Vorbehandlung verminderte

jedoch die Wiederfindung auf $70,9 \pm 1,7\%$ ($n = 15$) für Albumin, $63 \pm 6,1\%$ ($n = 20$) für Cholinesterase und $58,8 \pm 4,9\%$ ($n = 20$) für Sialinsäure der mit dem Verfahren C gemessenen Konzentrationen. Sie stieg aber bei der immunologischen Albuminbestimmung nach Zusatz von Diisopropylfluorophosphat $100 \mu\text{mol/l}$ auf $96 \pm 7,2\%$ ($n = 12$) an, so daß u. a. eine Proteolyse in den Ansätzen zu vermuten war. Enzyme wurden nach Anwendung des Inhibitors nicht bestimmt.

Während Triton X-100 1 g/l die Präzipitation nicht beeinflusste, nahm sie mit Polyethylenglykol 6000 konzentrationsabhängig zu. Sie wurde auch durch Natriumchlorid 1 mol/l , besonders bei Cholinesterase und alkalischer Phosphatase, verstärkt (Tab. 4). Dies deutete bei beiden Enzymen auf eine geringe hydrophobe Komponente der Bindung, die durch Ethylenglykol 1 mol/l allerdings nicht vermindert wurde, so daß im wesentlichen spezifische Interaktionen vorliegen müssen.

Schneckenlektin, das diskelektrophoretisch 10 Fraktionen und damit erhebliche Verunreinigungen aufwies, präzipitierte selbst nach Dialyse und unter optimalen Bedingungen (Natriumchlorid 1 mol/l , pH 7,0) kein Glykoprotein des Serums.

Während Weizenkeimlektin-Sepharose bei der Chromatographie nie Albumin adsorbierte, präzipitierten über 2% dieses kohlenhydratfreien Proteins bei allen Versuchen mit gelöstem Lektin. Dagegen fiel reines Humanalbumin (bis zu 8 mg im Ansatz) weder aus Lösungen in Natriumchlorid 154 mmol/l oder Puffer C aus, noch wurde es aus Proteinstandards bei der Präzipitation mitgerissen. Mit Weizenkeimlektin $240 \mu\text{mol/l}$ reagierten in diesen Gemischen β_2 -Glykoproteine

Tab. 3. Fällung von Sialoproteinen und Enzymen durch Weizenkeimlektin $120 \mu\text{mol/l}$ in Abhängigkeit vom pH-Wert. Angabe der Konzentrationen im Kontrollansatz (1 Tl. Serum mit 3 Tln. Puffer) und des nach Fällung im Überstand verbleibenden Anteils (mit Mittelwert und Standardabweichung, 10 Seren) der ursprünglichen Konzentration (jeweils 1,0). Vorgehen s. Methoden.

Kenngröße		pH-Wert			
		4,0	5,0	6,0	7,0
Sialinsäure	($\mu\text{mol/l}$)	531 \pm 133	528 \pm 130	533 \pm 127	525 \pm 136
Anteil im Überstand		0,560 \pm 0,055	0,604 \pm 0,065	0,591 \pm 0,072	0,666 \pm 0,060
Cholinesterase	(kU/l)	1,42 \pm 0,45	1,72 \pm 0,50	1,75 \pm 0,52	1,78 \pm 0,54
Anteil im Überstand		0,380 \pm 0,105	0,294 \pm 0,112	0,190 \pm 0,096	0,171 \pm 0,091
Arylamidase	(U/l)	7,88 \pm 2,42	14,6 \pm 4,1	15,3 \pm 4,28	15,2 \pm 4,24
Anteil im Überstand		0,266 \pm 0,072	0,280 \pm 0,067	0,305 \pm 0,081	0,337 \pm 0,088
γ -Glutamyltransferase	(U/l)	8,05 \pm 4,58	10,3 \pm 5,32	10,7 \pm 5,37	10,3 \pm 5,17
Anteil im Überstand		0,448 \pm 0,112	0,488 \pm 0,098	0,524 \pm 0,081	0,582 \pm 0,095
Alkalische Phosphatase	(U/l)	2,78 \pm 0,84	27,1 \pm 6,58	32,0 \pm 7,33	39,8 \pm 7,33
Anteil im Überstand		0,777 \pm 0,073	0,407 \pm 0,068	0,323 \pm 0,094	0,306 \pm 0,107

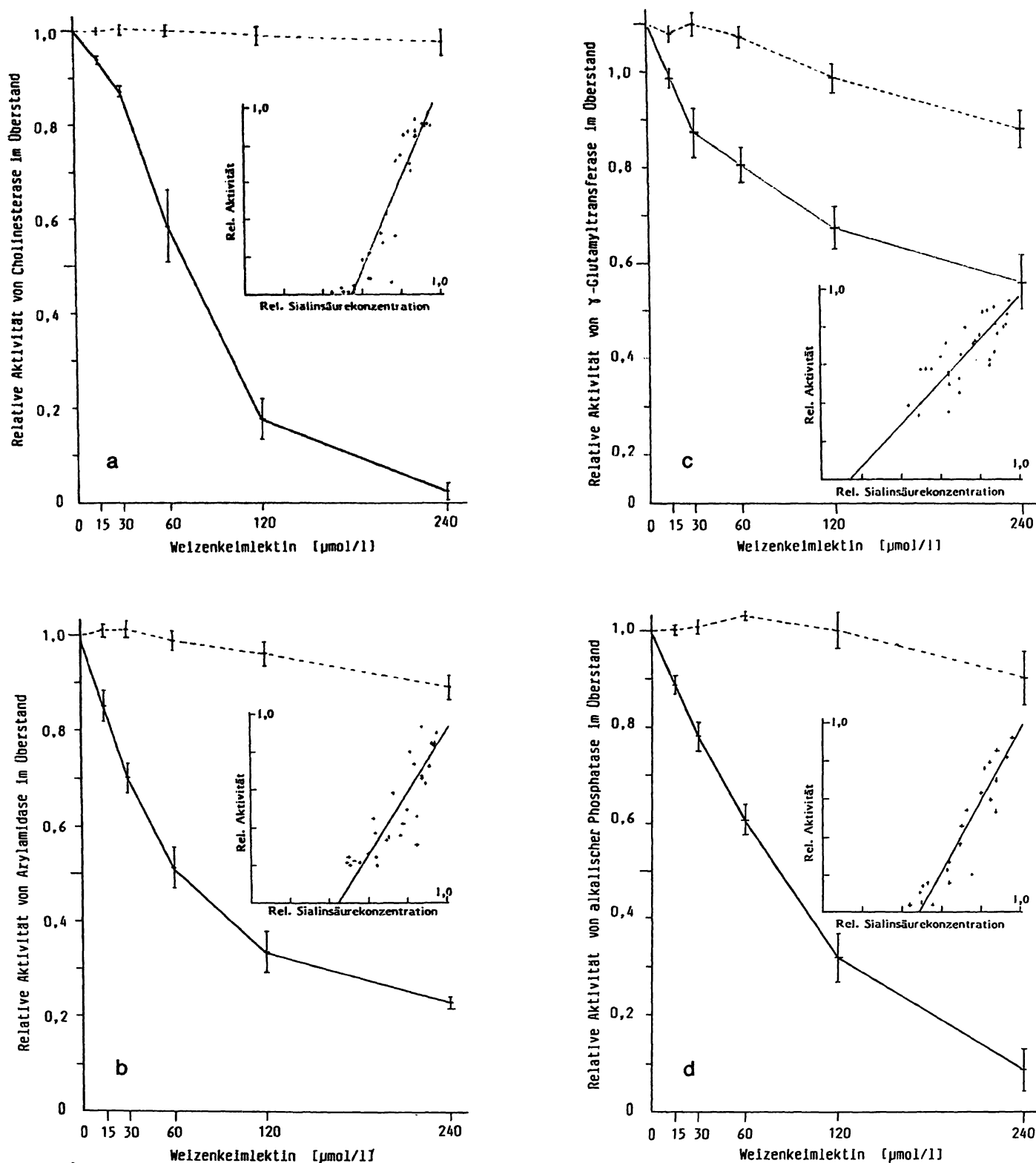


Abb. 3. Relative katalytische Konzentrationen (Ordinate) von Cholinesterase (a), Arylamidase (b), γ -Glutamyltransferase (c) und alkalischer Phosphatase (d) im Überstand von 10 Seren (Mittelwert und Standardabweichung) nach Fällung mit Weizenkeimlektin 0–240 $\mu\text{mol/l}$ bei 20 °C (Abszisse). Die Inserts zeigen die relativen katalytischen Konzentrationen (Ordinate), aufgetragen gegen den relativen Sialinsäuregehalt (Abszisse) in den zugehörigen Überständen. Korrelationen bei 50 Wertepaaren (Korrelationskoeffizienten r nach Pearson & Bravais, ρ nach Spearman) und Regressionsgleichungen (standardisierte Hauptkomponente):

Cholinesterase	$r = 0,033$	$\rho = 0,946$	$y = 2,39x - 1,28$
Arylamidase	$r = 0,863$	$\rho = 0,883$	$y = 1,63x - 0,72$
γ -Glutamyltransferase	$r = 0,790$	$\rho = 0,796$	$y = 1,10x - 0,15$
Alkalische Phosphatase	$r = 0,927$	$\rho = 0,921$	$y = 1,87x - 0,91$

Tab. 4. Einfluß verschiedener Bedingungen auf das Verhalten von N-Acetylneuraminsäure und Enzymen bei der Reaktion von Lektinen 120 µmol/l (60 min bei 25 °C) mit Seren. Die Dezimalzahlen bezeichnen den nach Fällung im Überstand verbleibenden Anteil (Mittelwert und Standardabweichung, n = 10) der ursprünglichen Konzentration (jeweils 1,0). Vorgehen s. Methoden.

Lektin und Modifikation	Sialinsäure	Cholinesterase	Arylamidase	γ-Glutamyltransferase	Alkalische Phosphatase
Concanavalin A	0,510 ± 0,095	0,031 ± 0,012	0,139 ± 0,085	0,342 ± 0,093	0,228 ± 0,078
Weizenkeimlektin	0,666 ± 0,060	0,171 ± 0,091	0,337 ± 0,088	0,582 ± 0,095	0,306 ± 0,107
mit Ethylenglykol 1 mol/l	0,579 ± 0,071	0,178 ± 0,102	0,295 ± 0,050	0,563 ± 0,070	0,214 ± 0,114
mit Natriumchlorid 1 mol/l	0,638 ± 0,062	0,050 ± 0,017	0,176 ± 0,087	0,444 ± 0,062	0,127 ± 0,061
mit Polyethylenglykol 6000					
7,5 g/l	0,635 ± 0,072	0,164 ± 0,087	0,318 ± 0,083	0,573 ± 0,093	0,301 ± 0,105
18,8 g/l	0,547 ± 0,061	0,075 ± 0,042	0,253 ± 0,066	0,540 ± 0,088	0,219 ± 0,077
37,6 g/l	0,541 ± 0,060	0,047 ± 0,025	0,214 ± 0,056	0,478 ± 0,051	0,165 ± 0,058
nach Neuraminidase	0,986 ± 0,005	0,907 ± 0,058	0,960 ± 0,020	0,875 ± 0,030	0,950 ± 0,025
Succinyliertes Weizenkeimlektin	0,915 ± 0,054	0,881 ± 0,056	0,958 ± 0,095	0,852 ± 0,090	0,992 ± 0,135
Schneckenlektin	0,989 ± 0,049	0,983 ± 0,045	0,971 ± 0,083	0,879 ± 0,122	0,980 ± 0,152

tein I (35% gefällter Anteil), saures α_1 -Glykoprotein (80%), α_2 -HS-Glykoprotein (40%), Hämoexin (90%), Haptoglobin (95%), C3c (20%), C4 (10%) und α_2 -Makroglobulin (> 95%) intensiver als in Seren (s. Tab. 2), so daß im Überstand dieser Proteingemische nur 15–20% der ursprünglichen Sialinsäurekonzentration verblieben. Wie bei Seren veränderte der Zusatz von Natriumchlorid 1 mol/l zur Erhöhung und Ethylenglykol 1 mol/l zur Aufhebung von hydrophoben Interaktionen den Fällungsgrad nur gering.

Eine Bildung von Neoglykoprotein war als Ursache der minimalen Präzipitation von Albumin aus Seren auszuschließen. Eine Inkubation von Albumin mit verschiedenen Zuckern führte nur im Ansatz mit D-Mannose 100 mmol/l zur Bildung von 10 µg Mannosyl-Albumin aus 30 mg Albumin, und zur Fällung durch Concanavalin A 120 µmol/l. Natives und succinyliertes Weizenkeimlektin präzipitierten behandeltes Albumin nie. Sialylreste ließen sich mit der Thiobarbitursäure-Reaktion nicht nachweisen. Dies entspricht der Theorie, da Zucker ohne Hydroxylgruppe am Kohlenstoffatom 1 (N-Acetylneuraminsäure trägt in dieser Position eine Carboxylgruppe) mit primären Aminogruppen kein Azomethin bilden können und bei Substitution am Kohlenstoffatom 2 (dort steht bei N-Acetylglucosamin der Acetylaminorest) nicht durch *Amadori*-Umlagerung in die stabile Ketoaminkonfiguration übergehen können.

Baumstark (16) wies nach, daß 1% der Albuminfraktion mit den Immunglobulinen G und A in Seren über Disulfidbrücken Komplexe bildete und deshalb von Concanavalin A-Sephrose adsorbiert wurde. Wir versuchten daher, entsprechend seinem Vorgehen, durch Zusatz von Thiolen die vermutete analoge Bin-

dung an Weizenkeimlektin zu verhindern. Bei Annahme von maximal 25 mmol/l SH-Gruppen für Albumin (errechnet aus 33 Cysteinresten pro Mol und einer Konzentration von Albumin 750 µmol/l im Serum) wurde in Gegenwart von 2-Mercaptoethanol 25 mmol/l gearbeitet. Die Mitfällung von Albumin ließ sich hierdurch deutlich reduzieren, sofern auch der Waschpuffer diesen Thiolgehalt aufwies, während sich die Präzipitation von Cholinesterase und proteingebundener Sialinsäure nicht veränderte (Tab. 5). Die Ergebnisse waren unabhängig davon, ob 2-Mercaptoethanol vor oder gleichzeitig mit den Lektinen den Seren zugesetzt wurde. Auch nachträgliches Waschen mit thiolhaltigem Puffer entfernte Albumin aus dem Präzipitat. Dagegen veränderte dieser Schritt – abgesehen von einer verminderten Albuminbande – nicht die Lage, Zahl und Stärke der Fraktionen in Pherogrammen der Niederschläge.

Diskussion

Weizenkeimagglutinin soll alkalische Phosphatase osärer Herkunft spezifisch binden (17–21), doch ist das Leberenzym bei Vorliegen einer Hepatitis (20) ebenfalls reaktiv, so daß Zweifel (22) an der Validität des Verfahrens bestehen, ohne daß die Natur der Interaktion mit diesem Lektin systematisch untersucht wurde (23). Wegen der höheren Affinität von N-Acetylglucosamin- gegenüber N-Acetylneuraminsäureresten wurde ersteren die Reaktion mit Weizenkeimlektin zugeschrieben (12). In Versuchen mit immobilisiertem Lektin war dagegen die Dichte der reaktiven Zucker des Glykoproteins und die Dichte der immobilisierten Lektinmoleküle, an der Matrix bedeutsamer als die Affinität beider (24). Bei Glyko-

Tab. 5. Einfluß von 2-Mercaptoethanol 25 mmol/l (im Ansatz und zusätzlich im ersten Waschpuffer) auf die Fällung von Albumin, Cholinesterase und proteingebundener N-Acetylneuraminsäure durch Lektine 120 µmol/l. Die Dezimalzahlen bezeichnen den Anteil des Niederschlags (Mittelwert und Standardabweichung, (n = 10) am ursprünglichen Gehalt im Serum (1,0). — Vorgehen s. Methoden.

	ohne Zusatz	mit 2-Mercaptoethanol	
		nur im Ansatz	und im Waschpuffer 1
Concanavalin A			
Albumin	0,0288 ± 0,0068	0,0193 ± 0,0019	0,0048 ± 0,0017
Cholinesterase	0,981 ± 0,0083	0,985 ± 0,0092	0,978 ± 0,0126
Sialinsäure	0,476 ± 0,088	0,490 ± 0,075	0,461 ± 0,082
Weizenkeimlektin			
Albumin	0,0237 ± 0,0051	0,0188 ± 0,0025	0,0058 ± 0,0015
Cholinesterase	0,883 ± 0,0090	0,859 ± 0,0113	0,827 ± 0,097
Sialinsäure	0,336 ± 0,067	0,356 ± 0,071	0,341 ± 0,084

phorin, Fetuin und Mucinen führte die Entfernung der peripheren und damit zugänglichen Sialylreste auch zum Verlust der Lektinbindung mit den erhaltenen N-Acetylglucosaminresiduen (25). Nach Untersuchungen an Glykopeptiden (26) ermöglichte erst die schwache Wechselwirkung von Weizenkeimlektin mit Sialylgruppen intermediäre und starke Bindungen an interne N-Acetylglucosaminsequenzen.

Unsere Ergebnisse machen diesen Reaktionsmechanismus von Weizenkeimagglutinin auch für Serumproteine wahrscheinlich. Die Interaktion mit Sialylresten allein führt nicht zu einer Bindung, da — in Übereinstimmung mit Dörner & Sachs (27) — Schneckenlektin trotz intensiver spezifischer Wechselwirkungen mit Sialoproteinen (28) keines der untersuchten Glykoproteine fällte. Dennoch sprechen folgende Beobachtungen für eine spezifische und entscheidende Beteiligung von N-Acetylneuraminsäure:

- Die Konzentrationen von Sialinsäure und katalytischer Aktivität korrelieren eng, vor allem bei der Präzipitation von Cholinesterase und alkalischer Phosphatase (Abb. 3).
- Die Gegenwart von N-Acetylneuraminsäure 0,25 mol/l verhindert eine Fällung durch Weizenkeimlektin.
- Eine vollständige Desialylierung durch Neuraminidase hebt die Bindung auf. Nur bei sehr hohen Lektinkonzentrationen findet man eine geringe Reaktion.
- Succinyliertes Weizenkeimlektin, das nur N-Acetylglucosamin-, aber nicht die sterisch ähnlichen N-Acetylneuraminreste erkennt (4), präzipitiert nicht.
- Die Fällung proteingebundener Sialinsäure ist vom pH-Wert unabhängig.

Diese Ergebnisse legen spezifische Wechselwirkungen nahe. Hingegen geben folgende Befunde Hinweise auf Ladungseffekte und unspezifische Interaktionen:

- Der Reaktivität individueller Glykoproteine entspricht nicht ihrem Gehalt an N-Acetylneuraminsäure und/oder N-Acetylglucosamin (Tab. 2).
- Eine erschöpfende Fällung durch Erhöhung der Lektinkonzentration gelingt nicht. Selbst bei Ausfällung aller Lektin-Glykoprotein-Aggregate durch Zentrifugation der Ansätze bei 5 °C bleibt ein erheblicher Anteil von Sialoproteinen im Überstand, obwohl Sialinsäure als terminaler Zucker zugänglich ist. Offenbar bilden sich Kopräzipitate der gefällten Komplexe mit überschüssigem Lektin, da die Proteinkonzentration des Niederschlags stärker als sein Sialinsäuregehalt ansteigt (Abb. 1).
- Zunehmende Ionenstärke im Ansatz verstärkt die Fällung, ohne daß wegen der fehlenden Wirkung von Ethylenglykol und Triton X-100 hydrophobe Interaktionen anzunehmen sind.
- Weizenkeimlektin fällt Spuren von Serumalbumin auch in Gegenwart von kompetitiv hemmenden Zuckern.
- Auch kohlenhydratfreie Proteine reagieren schwach. Da die Spaltung von Disulfidbrücken diese Wechselwirkung fast vollständig aufhebt, ist eine Komplexbildung von Albumin mit Glykoproteinen als Ursache dieses Verhaltens zu vermuten; denn gereinigtes Albumin wird nicht gefällt.

Wegen dieser Beobachtungen wird auch eine elektrostatische Bindung (6) zwischen Weizenkeimlektin und den Sialinsäureresten der Glykoproteine diskutiert (4, 29), da das gut lösliche und bei pH 7,0 negativ geladene Succinylderivat nicht reagiert. Nach Gallagher et al. (26) ist die Bindung an N-Acetylglucosaminreste

spezifisch und wird erst durch die Herstellung produktiver Kontakte (25) bei der vorausgehenden Reaktion der N-Acetylneuraminsäuregruppen ermöglicht. Dagegen gibt die mathematische Auswertung der Fällungskurven von Enzymen durch steigende Lektinkonzentrationen (Abb. 3) keinen Hinweis für das Vorliegen kooperativer spezifischer und hydrophober Bindungen (30) an derselben Glykankomponente. Während Rinderserumalbumin die Avidität gelöster Lektine erhöht (31), reagierten bei unseren Versuchen mit Weizenkeimlektin Glykoproteine in Proteinstandards intensiver als in Seren.

Durch Fällung erhält man, im Gegensatz zur chromatographie an Weizenkeimlektin-(WGA)-Sephrose, hohe Proteinkonzentrationen, die gute Pherogramme liefern. Diese Muster reflektieren jedoch nicht die wahre Verteilung von Sialoproteinen im Serum, da nach den Daten von Tabelle 2 keine Wiedergabe entsprechend der Konzentration erfolgt. Sie besitzen daher bestenfalls orientierenden Charakter.

Damit erfährt der analytische Einsatz von Weizenkeimlektin trotz seiner Bindung an Sialoproteine des Serums erhebliche Einschränkungen: Die Reaktion in Lösung verläuft nicht stöchiometrisch, und die elektrophoretische Darstellung ist daher nicht repräsentativ. Seine Eignung zur Diagnostik bei neoplastisch bedingter Zunahme der Konzentration von N-Acetylneuraminsäure im Serum (32), zum Nachweis carcinospezifischer Glykoproteine (33) oder eines erhöhten Sialinsäuregehalts in γ -Glutamyltransferase aus Tumoren (34) ist daher ebenso zurückhaltend zu beurteilen wie beim erwähnten Einsatz zur Differenzierung multipler Formen der alkalischen Phosphatase.

Danksagung

Wir danken den Damen *Barbara Flatter*, *Barbara Gütschow* und *Annette Hinrichs* für ihre ausgezeichnete technische Assistenz bei den Untersuchungen.

Literatur

- Lorentz, K., Flatter, B. & Kolle, F. W. (1979) *diese Z.* 17, 757–765.
- Lorentz, K. (1981) *diese Z.* 19, 1181–1187.
- Jordan, F., Bassett, E. & Redwood, W. R. (1977) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 75, 1015–1021.
- Monsigny, M., Roche, A.-C., Sene, C., Maget-Dana, R. & Delmotte, F. (1980) *Eur. J. Biochem.* 107, 147–153.
- Ben-Yoseph, Y., Defranco, C. L. & Nadler, H. L. (1979) *Clin. Chim. Acta* 99, 31–35.
- Vretblad, P. & Hjorth, R. (1978) In: *Affinity Chromatography* (Hoffmann-Ostenhof, O. et al., Hrsg.) pp. 291–294, Verlag Pergamon Press, New York.
- Richterich, R. (1971) *Klinische Chemie: Theorie und Praxis*, 3. Aufl., pp. 533–535. Verlag S. Karger, Basel.
- Lorentz, K., Weiß, T. & Kraas, E. (1986) *diese Z.* 24, 189–198.
- Warren, L. (1963) *Meth. Enzymol.* 6, 463–464.
- Lau, Ch. K. & Fujitaki, J. M. (1981) *Anal. Biochem.* 110, 144–145.
- Lorentz, K. & Flatter, B. (1977) *diese Z.* 15, 101–108.
- Nilsson, M. & Bøg-Hansen, T. C. (1979) *Prot. Biol. Fluids* 27, 599–602.
- Karlson, P., Gerok, W. & Groß, W. (1978) *Pathobiochemie*, 1. Aufl., pp. 338–342, Georg Thieme Verlag, Stuttgart.
- Uhlenbruck, G., Reese, I., Vaith, P. & Haupt, H. (1979) *diese Z.* 17, 29–34.
- Schultze, H. E. & Heremans, J. F. (1966) *Molecular Biology of Human Proteins*, Vol. 1, pp. 173–229, Elsevier, Amsterdam–London–New York.
- Baumstark, J. S. (1983) *Prep. Biochem.* 13, 315–345.
- Rosalki, S. B. & Foo, A. Y. (1984) *Clin. Chem.* 30, 1182–1186.
- Rosalki, S. B. & Foo, A. Y. (1985) *Clin. Chem.* 31, 1198–1200.
- Schreiber, W. E. & Whitta, L. (1986) *Clin. Chem.* 32, 1570–1573.
- Behr, W. & Barnert, J. (1986) *Clin. Chem.* 32, 1960–1966.
- Onica, D., Sundblad, L. & Waldenlind, L. (1986) *Clin. Chim. Acta* 155, 285–294.
- Desoize, B., Cravero, L. & Jardillier, J. C. (1985) *Ann. Biol. Clin.* 43, 630.
- Schreiber, W. E. & Whitta, L. (1987) *Clin. Chem.* 33, 185–186.
- Bhavanandan, V. B. & Katlic, A. W. (1979) *J. Biol. Chem.* 254, 4000–4008.
- Peters, B. P., Ebisu, S., Goldstein, I. J. & Flashner, M. (1979) *Biochemistry* 18, 5505–5511.
- Gallagher, J. T., Morris, A. & Dexter, T. M. (1985) *Biochem. J.* 231, 115–122.
- Dörner, R. & Sachs, V. (1986) In: *Lectins* (Bøg-Hansen, T. C. & van Driessche, E., Hrsg.) Bd. 5, Vol. 5, pp. 600–607, Verlag Walter de Gruyter & Co., Berlin.
- Miller, R. L., Collawn jr., J. F. & Fish, W. W. (1982) *J. Biol. Chem.* 257, 7574–7580.
- Rice, R. H. & Etzler, M. E. (1975) *Biochemistry* 14, 4093–4099.
- Köttgen, E., Bauer, Ch., Schmitt, S., Mössner, W. & Gerok, W. (1980) *Fresenius Z. Anal. Chem.* 301, 194–195.
- Judd, W. G. (1979) *Transfusion* 19, 768–772.
- W. P. Bradley, A. P. Blasco, J. F. Weiss, J. C. Alexander jr., N. A. Silverman & P. C. Chretien (1977) *Cancer* 17, 2264–2272.
- Bolmer, S. D. & Davidson, E. A. (1981) *Biochemistry* 20, 1047–1054.
- Huseby, N.-E. & Eide, T. J. (1983) *Clin. Chim. Acta* 135, 301–307.

Prof. Dr. Klaus Lorentz
Institut für Klinische Chemie
Medizinische Universität zu Lübeck
Kronsfordter Allee 71–73
D-2400 Lübeck